(19) DANMARK

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **149861 B**

(21) Patentansøgning nr.: **3772/82**

(51) Int.Cl.[4]: **C 07 H 19/167**

(22) Indleveringsdag: **23 aug 1982**

(41) Alm. tilgængelig: **25 feb 1983**

(44) Fremlagt: **13 okt 1986**

(86) International ansøgning nr.: –

(30) Prioritet: **24 aug 1981 IT 23603/81**

(71) Ansøger: **BIORESEARCH S.P.A.; Milano, IT.**

(72) Opfinder: **Federico *Gennari; IT.**

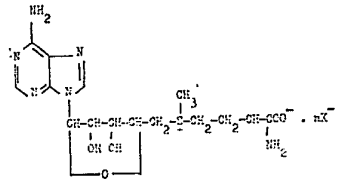
(74) Fuldmægtig: **Patentbureauet Hofman–Bang & Boutard**

(54) **Analogifremgangsmåde til fremstilling af S–adenosyl–methioninsalte**

(57) Sammendrag:

3772-82

Stabile S-adenosylmethioninsalte (SAM-salte) med formlen:



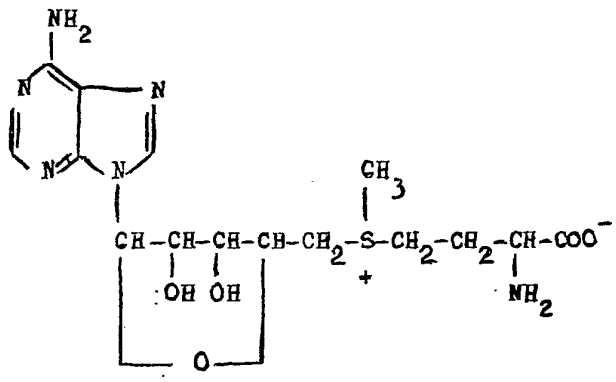
hvori X er en syreækvivalent af en stærk mineralsyre med en pK-værdi mindre end 2,5, og hvori n er 4, 5 eller 6, fremstilles ved at lede en koncentreret vandig opløsning af et råt SAM-salt igennem en svagt sur ionbytterkolonne og eluere SAM med en syre HX. Efter en nøjagtig indstilling af den støkiometriske mængde HX og en koncentrering af opløsningen skilles det rene salt fra ved lyophilisering.

Saltene, der er stabile ved temperaturer op til 45 °C i ubegrænsede tidsperioder, er praktisk taget ikke-toxiske og finder anvendelse inden for den humane terapi.

DK 149861 B

Den foreliggende opfindelse angår en analogifremgangsmåde til fremstilling af en hidtil ukendt klasse af S-adenosylmethioninsalte (SAM-salte), som er særdeles stabile ved forhøjede temperaturer og i praktisk talt ubegrænsede tidsperioder, og fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i krav 1's kendetegnende del anførte.

Det er velkendt, at S-adenosylthionin er et produkt af naturlig oprindelse, som er tilstede i alle levende organismer, i hvilke produktet syntetiseres aktivt ved hjælp af et specifikt enzym. Produktet svarer til den følgende strukturformel:



SAM deltager i et stort antal metaboliske processer af fundamental betydning for den menneskelige organisme, og en mangel på denne forbindelse ligger følgelig til grund for mange organiske forstyrrelser.

Selv om den biologiske betydning af denne forbindelse har været kendt i flere årtier, har muligheden for at afprøve forbindelsen og dermed muligheden for at anvende forbindelsen som medikament først vist sig i de senere år, hvilket skyldes forbindelsens ekstreme ustabilitet ved temperaturer over 0 °C.

Således lykkedes det først i 1975 for ansøgerne at fremstille et SAM-salt, som var tilstrækkeligt stabilt ved 25 °C

(USA patentskrift nr. 3 893 999) efterfulgt af et antal salte, som udviste god stabilitet ved 45 °C (USA patentskrifterne nr. 3 954 726 og nr. 4 057 686 fra henholdsvis 1976 og 1977).

Nærmere bestemt omtaler USA patentskrift nr. 3 893 999 forbindelsen SAM-tri-p-toluensulfonat, USA patentskrift nr. 3 954 726 omtaler forbindelsen SAM-disulfat-di-p-toluensulfonat, og USA patentskrift nr. 4 057 686 beskriver en gruppe af SAM-salte, som tilsammen kan angives som SAM. $4RSO_3H$ eller SAM . $3RSO_3H$, hvori RSO_3H angiver en sulfonsyreækvivalent, som kan være delvis substitueret med en ækvivalent svovlsyre.

I det sidstnævnte USA patentskrift anføres det, at man har forsøgt at fremstille SAM-salte, som er stabile under normale temperatur- og fugtighedsbetingelser. Således har man fremstillet chloridet og sulfatet af SAM, men disse salte kan kun anvendes som reagenser inden for biokemien og kun i meget kort tid, fordi de selv i tør tilstand kun har en begrænset stabilitet ved lave temperaturer.

Ansøgeren var ikke i stand til at forklare årsagen til, at kun de salte, der specifikt var nævnt i kravene i de ovennævnte patentskrifter, var stabile, mens tidligere fremstillede SAM-salte (nærmere bestemt monochloridet og disulfatet) kun udviste en begrænset stabilitet, når de blev holdt ved en temperatur på 4 °C. Det var heller ikke muligt at forklare, hvorfor tri-p-toluensulfonatet kun var stabilt op til 25 °C, mens disulfat-di-p-toluensulfonatet var stabilt op til 45 °C.

Det har nu overraskende vist sig, at det er muligt at opnå stabile SAM-salte, når SAM underkastes saltdannelse med 5 mol af en stærk uorganisk syre med en pK-værdi på under 2,5 valgt blandt HCl, H_2SO_4 og H_3PO_4.

Nærmere bestemt har det overraskende vist sig, at hvis man

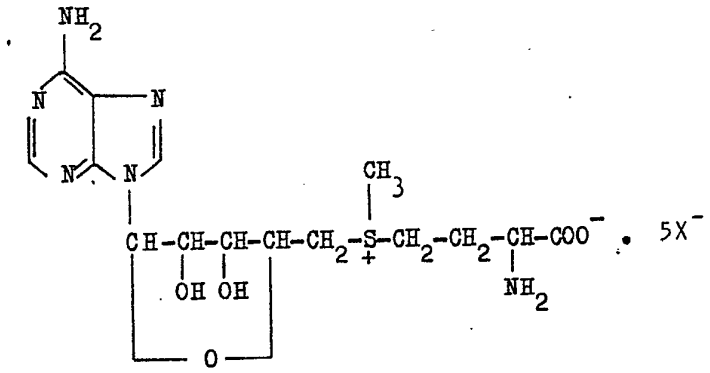
danner salte imellem SAM og en af de ovennævnte syrer med en pK-værdi på under 2,5, opnår man et salt med maksimal stabilitet, når dette salt indeholder 5 mol syre. Salte indeholdende 4 eller 6 mol syre har en stabilitet, som ganske vist er god, men som er betydelig mindre.

Salte, som indeholder 1-3 mol syre, er helt uacceptable til terapeutisk anvendelse, hvilket skyldes, at de udsættes for kraftig nedbrydning.

Det skal bemærkes, at eftersom de hidtil ukendte salte fremstillet ifølge opfindelsen alle finder anvendelse inden for den humane terapi, er tilstedeværelsen af selv små procentdele nedbrudte produkter uacceptabel, ikke blot på grund af det tilsvarende fald i aktiviteten, men også (og i særdeleshed) fordi denne tilstedeværelse angiver dannelsen af metabolitter, som har vist sig at være lettere toxiske, og som er i stand til at gribe ind i de biologiske processer.

Som et yderligere kendetegn ved den foreliggende opfindelse har det også vist sig, at stabiliteten af de omhandlede SAM-salte direkte påvirkes af omgivelsernes polaritet, og i særdeleshed påvirkes saltenes stabilitet af den mængde fugtighed, der er tilstede. Man har derfor fundet midler, som kan reducere denne fugtighedsmængde til værdier tæt på nul.

Saltene fremstillet ifølge opfindelsen har den almene formel



hvori X er syreækvivalenten af HCl, H_2SO_4 eller H_3PO_4..

I praksis har det vist sig, at X kun kan være en ækvivalent af HCl, H_2SO_4 eller H_3PO_4, eftersom eksempelvis HNO_3 og $HClO_4$ er syrer, som er terapeutisk uacceptable på grund af deres toxicitet, og HBr og HI kan ikke anvendes, fordi de udløser en demethylering af SAM.

De syrer, som ifølge opfindelsen kan anvendes til fremstilling af saltene, har de følgende pK-værdier:

HCl : pK $<$ 0,5
H_2SO_4 : pK $<$ 0,5 (1. trin); pK = 1,92 (2. trin)
H_3PO_4 : pK = 2,12 (1. trin)

De ifølge opfindelsen fremstillede hidtil ukendte salte har vist sig meget nyttige inden for talrige områder af den humane terapi, eksempelvis som hepato-protektorer, hvilket vil blive uddybet nærmere i det følgende.

Ifølge opfindelsen fremstilles saltene ved en fremgangsmåde, der omfatter de følgende procestrin. Disse er alle kritiske for opnåelsen af et produkt med en absolut konstant og reproducerbar farmaceutisk renhed:

a) fremstilling af en koncentreret vandig opløsning af et råt SAM-salt ved en vilkårlig kendt metode;

b) rensning af opløsningen ved chromatografi ved passage af opløsningen igennem en kolonne indeholdende en svagt sur ionbytterharpiks;

c) eluering af SAM med en fortyndet vandig opløsning af den ønskede syre HX;

d) titrering af eluatet og justering af syremængden til den nøjagtige støkiometriske mængde i relation til den tilstedeværende SAM;

e) koncentrering af eluatet, og

f) lyophilisering.

Den vandige opløsning fremstillet i trin (a) kan naturligvis indeholde ethvert opløseligt SAM-salt, eftersom anionen elimineres i den efterfølgende passage igennem ionbytterkolonnen, hvorved anionen ikke kan gribe ind i resten af processen. Ved de normale processer, som omfatter en koncentration og en ekstraktion af SAM fra gær, opnår man almindeligvis en opløsning, som indeholder SAM^+-ioner og SO_4^{--}-ioner.

I alle tilfælde indstilles opløsningens pH til en værdi på mellem 6 og 7, fortrinsvis 6,5.

Det chromatografiske rensningstrin (b) gennemføres fortrinsvis ved brug af en ionbytterharpiks af typen Amberlite® IRC50 eller Amberlite® CG50.

Elueringen i trin (c) gennemføres fortrinsvis ved brug af en vandig 0,1 N opløsning af den ønskede syre.

Hvis en titrering af eluatet (trin d) viser, at mængden af tilstedeværende syreækvivalenter er mindre end den påkrævede mængde på 5 ækvivalenter, hvilket er almindeligt, tilsætter man en syremængde, som nøje svarer til den påkrævede mængde, i form af en kommerciel koncentreret vandig opløsning. Hvis det imidlertid viser sig, at der er et overskud af syre tilstede, elimineres dette overskud ved behandling af opløsningen med en stærkt basisk ionbytterharpiks på OH^--form, eksempelvis Amberlite® IRA-401.

I trin (e) koncentrerer man eluatet til en optimal værdi for den efterfølgende lyophiliseringsproces, dvs. til en værdi på mellem 50 og 100 g/liter, fortrinsvis omkring 70 g/liter.

Den afsluttende lyophilisering gennemføres ved sædvanlige metoder, således at der opnås et fuldstændigt krystallinsk salt med en renhed på 100%.

Hvis lyophiliseringen gennemføres i nærværelse af en egnet inert substans, opnår man et produkt med et mindre indhold af residuel fugtighed, hvilket produkt derfor er mere stabilt.

Mere specifikt har det vist sig, at lyophiliseringen bør gennemføres i nærværelse af mannitol, hvis det fremstillede salt tænkes anvendt på en injicerbar farmaceutisk form. Hvis saltet derimod tænkes anvendt til fremstilling af orale tabletter, bør lyophiliseringen gennemføres i nærværelse af findelt kiselsyre.

Opfindelsen illustreres nærmere ved de efterfølgende eksempler.

EKSEMPEL 1

110 liter ethylacetat og 110 liter vand sættes ved omgivelsestemperatur til 900 kg gær beriget med SAM (6,88 g/kg) i overensstemmelse med Schlenk (Enzymologia, 29, 283, (1965)).

Efter kraftig omrøring i 30 minutter tilsættes 500 liter 0,35 N svovlsyre, og omrøringen opretholdes i yderligere 1,5 timer.

Blandingen filtreres, og resten vaskes med vand, hvilket giver 1400 liter af en opløsning indeholdende 4,40 g/liter SAM svarende til 99,5% af indholdet i udgangsmaterialet.

Til opløsningen sættes under omrøring 23 kg picroloninsyre i 250 liter methylethylketon.

Efter henstand natten over skilles bundfaldet fra ved centrifugering, hvorefter det vaskes med vand.

Bundfaldet opløses ved, at det under omrøring ved omgivelsestemperatur udhældes i 62 liter af en 1 N opløsning af svovlsyre i methanol.

Efter frafiltrering af spor af uopløselige materialer sættes 500 liter acetone til opløsningen.

Når bundfaldet har sat sig fuldstændigt, dekanteres supernatanten fra, og den uopløselige rest vaskes med en lille mængde acetone.

Bundfaldet opløses i 800 liter destilleret vand, der tilsættes 2 kg affarvende trækul, og blandingen filtreres.

Man fremstiller en kolonne indeholdende 200 liter Amberlite® IRC 50 harpiks på H^+-form, og denne kolonne vaskes omhyggeligt med destilleret vand.

Til den ovenfor opnåede vandige opløsning sættes under omrøring 4,8 kg iseddikesyre, hvorefter en 2 N opløsning af NaOH tilsættes, indtil der opnås en pH-værdi på 6,5.

Opløsningen ledes igennem ionbytterkolonnen med en hastighed på 400 liter/time, hvilken hastighed holdes konstant under hele processen.

Derefter gennemledes successivt 200 liter destilleret vand, 1600 liter 0,1 M eddikesyre og yderligere 200 liter destilleret vand.

Man eluerer SAM med 400 liter 0,1 N svovlsyre. De således opnåede 400 liter eluat indeholder omkring 4 kg SAM, og eluatet koncentreres under vakuum til 60 liter.

Der tilsættes 0,5 kg trækul, og blandingen filtreres. Derefter titreres opløsningen.

Man tilsætter koncentreret svovlsyre, indtil det molære forhold imellem H_2SO_4 og SAM er 2,5:1, hvorefter opløsningen lyophiliseres.

Man opnår 6,5 kg produkt med følgende sammensætning: SAM^+ 61%; H_2SO_4 37,5%; H_2O 1,5%.

Saltet har et krystallinsk udseende, og det er opløseligt i vand i en udstrækning på mere end 20% under dannelse af en farveløs opløsning, hvorimod det er uopløseligt i almindelige organiske opløsningsmidler.

Tyndtlagschromatografi i overensstemmelse med Anal. Biochem. 4, 16 - 28 (1971) viser, at produktet er fri for urenheder.

I den nedenstående tabel 1 er angivet analysedata, som stemmer overens med en forbindelse med formlen

$$C_{15}H_{22}N_6O_5S.\ 2{,}5H_2SO_4.\ 0{,}5H_2O.$$

Den hidtil ukendte forbindelse er også identificeret ved en enzymatisk metode baseret på en enzymatisk methylering af nicotinamid og guanidineddikesyre med SAM (G.L. Cantoni, J. Biol. Chem. 189, 745 (1951); G. De La Hoba, B.A. Jameison, S.H. Mudde, H.H. Richards, J. Am. Chem. Soc. 81, 3975 (1959)).

Man gentager den ovenfor beskrevne proces på lignende måde, idet man inden lyophiliseringen tilsætter en mængde svovlsyre, således at molforholdet bliver 3:1 i forhold til SAM. Herved opnås saltet SAM . $3H_2SO_4$. $0{,}7H_2O$, hvis analytiske data er anført i tabel 1.

Når man på tilsvarende måde nedbringer det molære forhold imellem H_2SO_4 og SAM til 2:1 inden lyophiliseringen, opnår man saltet SAM . $2H_2SO_4$. $0,4H_2O$, hvis analytiske data er anført i tabel 1.

EKSEMPEL 2

11,5 kg picroloninsyre opløst i 100 liter isobutylalkohol sættes til 700 liter af en opløsning opnået ved lysering af gærceller ved anvendelse af det samme råmateriale og den samme metode som beskrevet i eksempel 1.

Efter henstand natten over skilles det dannede bundfald fra ved centrifugering.

Bundfaldet opløses ved omgivelsestemperatur under omrøring i 31 liter af en 1 N opløsning af svovlsyre i ethanol.

Efter frafiltrering af en lille mængde uopløselige materialer sættes 250 liter diethylether til opløsningen.

Efter henstand filtreres blandingen, og det faste produkt vaskes med en lille mængde ether. Produktet tørres under vakuum.

Det faste produkt opløses i 400 liter vand, og der tilsættes 1 kg affarvende trækul, hvorefter blandingen filtreres.

Efter tilsætning af iseddikesyre justeres pH-værdien til 6,5, og opløsningen ledes igennem en kolonne indeholdende Amberlite®IRC 50 som beskrevet i eksempel 1.

Man eluerer SAM fra kolonnen ved anvendelse af 200 liter 0,1 N saltsyre.

Den eluerede SAM koncentreres under vakuum til et volumen på 30 liter. Der tilsættes 0,25 kg aktiveret trækul, og

blandingen filtreres. Opløsningen titreres, og der tilsættes koncentreret saltsyre i en mængde, der er tilstrækkelig til opnåelse af et molært forhold imellem HCl og SAM på 5:1. Opløsningen lyophiliseres.

Der opnås 2,8 kg produkt med følgende sammensætning: SAM^+ 67,6%; HCl 30,9%; H_2O 1,5%.

Saltet har et krystallinsk udseende, og det er opløseligt i vand i en udstrækning på mere end 20% under dannelse af en farveløs opløsning. Det er ringe opløseligt i almindelige organiske opløsningsmidler.

Tyndtlagschromatografi som beskrevet i eksempel 1 viser, at forbindelsen er fri for urenheder.

De analytiske data er anført i tabel 1 og stemmer overens med et produkt med formlen:

$C_{15}H_{22}N_6O_5S \cdot 5HCl$.

Den hidtil ukendte forbindelse er også identificeret ved den enzymatiske metode beskrevet i eksempel 1.

Ved at gå frem som angivet i eksempel 1 er det muligt at opnå salte svarende til forskellige grader af saltdannelse, i særdeleshed følgende salte:

$SAM \cdot 4HCl \cdot 0{,}4H_2O$
$SAM \cdot 6HCl \cdot 0{,}7H_2O$

hvis analytiske data er anført i tabel 1.

EKSEMPEL 3

Den i eksempel 1 beskrevne fremstilling gentages med den undtagelse, at der til opløsningen sættes 4,75 kg af en

pyrogen mannitol inden lyophiliseringen. Derefter lyophiliseres opløsningen på sædvanlig måde.

Tilsætningen af mannitol som støtte for lyophiliseringen gør det muligt at opnå et produkt, hvis indhold af residuel fugtighed er 0,1%.

Det på denne måde opnåede produkt er velegnet til omdannelse til injicerbare farmaceutiske former.

EKSEMPEL 4

Man følger den i eksempel 1 beskrevne procedure, idet der til opløsningen sættes 4 kg aerosil (pulveriseret kilselsyre) inden lyophiliseringen. Den resulterende kolloide suspension lyophiliseres derefter.

Tilsætningen af aerosil som støtte for lyophiliseringen gør det muligt at opnå et produkt, hvis indhold af residuel fugtighed er 0,2%.

Produktet opnået på den måde er egnet til omdannelse til tabletter, der kan anvendes oralt.

EKSEMPEL 5

Man gentager den i eksempel 2 beskrevne procedure med den undtagelse, at SAM elueres med en 0,1 M opløsning af phosphorsyre og ikke med 0,1 N saltsyre.

Inden lyophiliseringen tilsættes en tilstrækkelig mængde koncentreret phophorsyre til opnåelse af et molært forhold imellem H_3PO_4 og SAM på 5:1.

Der opnås 4,26 kg produkt med følgende sammensætning: SAM^+ 44,4%; H_3PO_4 54,6%; H_2O 1%.

De analytiske data er anført i den efterfølgende tabel 7 og stemmer overens med et produkt med formlen:

$C_{15}H_{22}N_6O_5S \cdot 5H_3PO_4 \cdot 0{,}5H_2O$

Tyndtlagschromatografi som beskrevet i eksempel 1 viser, at forbindelsen er fri for urenheder.

Den hidtil ukendte forbindelse er ligeledes identificeret ved den enzymatiske metode beskrevet i eksempel 1.

Ved at gå frem som beskrevet i eksempel 1 kan man opnå salte svarende til forskellige grader af saltdannelse, i særdeleshed følgende salte:

$SAM \cdot 4H_3PO_4 \cdot 0{,}4H_2O$
$SAM \cdot 6H_3PO_4 \cdot 0{,}7H_2O$

De analytiske data af disse salte er anført i tabel 1.

TABEL 1

Salt	Empirisk formel	% N Beregnet	% N Fundet	% S Beregnet	% S Fundet	% SAM Beregnet	% SAM Fundet	EL% 256 nm (6N H_2SO_4)
SAM. $2H_2SO_4$. $0,4H_2O$	$C_{15}H_{26}N_6O_{13}S_3$. $0,4H_2O$	13,98	14,00	15,97	16,01	66,2	66,3	242
SAM. $2.5H_2SO_4$. $0,5H_2O$	$C_{15}H_{27}N_6O_{15}S_{3.5}$ $0,5H_2O$	12,88	12,86	17,18	17,15	61,0	60,9	223
SAM. $3H_2SO_4$. $0,7H_2O$	$C_{15}H_{28}N_6O_{17}S_4$. $0,7H_2O$	11,91	11,89	18,16	18,05	56,5	56,4	207
SAM. 4HCl. $0,4H_2O$	$C_{15}H_{26}N_6O_5SCl_4$. $0,4H_2O$	15,25	15,55	5,81	5,93	72,2	72,4	264
SAM. 5HCl $0,5H_2O$	$C_{15}H_{27}N_6O_5SCl_5$. $0,5H_2O$	14,26	14,25	5,43	5,44	67,6	67,6	247
SAM. 6HCl. $0,7H_2O$	$C_{15}H_{28}N_6O_5SCl_6$. $0,7H_2O$	13,33	13,15	5,08	5,03	63,2	63,1	231
SAM. $4H_3PO_4$. $0,4H_2O$	$C_{15}H_{34}N_6O_{21}SP_4$. $0,4H_2O$	10,53	10,54	4,01	4,03	50,0	49,9	176
SAM. $5H_3PO_4$. $0,5H_2O$	$C_{15}H_{37}N_6O_{25}SP_5$. $0,5H_2O$	9,35	9,33	3,56	3,55	44,4	44,4	156
SAM. $6H_3PO_4$. $0,7H_2O$	$C_{15}H_{40}N_6O_{29}SP_6$. $0,7H_2O$	8,4	8,38	3,2	3,2	39,9	39,9	140

149861

Man har gennemført stabilitetsundersøgelser af de fremstillede salte, og disse undersøgelser foregik ved, at man holdt produktet i en ovn med en fastsat temperatur på 45 °C, mens man på bestemte tidspunkter målte det procentvise indhold af residuelt salt. Forsøgene blev gennemført i sammenligning med SAM. n HCl-salte, hvori n = 1,2 og 3, fremstillet ved en kendt fremgangsmåde (USA patentskrift nr. 2 969 353) og i sammenligning med SAM. n,H_2SO_4-salte hvori n = 0,5, 1 og 1,5, ligeledes fremstillet ved en kendt fremgangsmåde (tysk patentansøgning nr. 1 803 978).

De efterfølgende tabeller viser de procentvise indhold af dekomponerede salte på de angivne tidspunkter:

TABEL 2

SAM. n HCl

n	resterende fugtighed	Nedbrydning ved 45 °C efter 60 dage	120 dage	180 dage	240 dage	360 dage
1	0,2%	100%	100%	100%	100%	100%
2	0,5%	80%	100%	100%	100%	100%
3	0,8%	30%	60%	80%	100%	100%
4	1 %	5%	10%	14%	17%	20%
5	1,5%	-	1,5%	3%	4,5%	5%
6	2 %	5%	10%	14%	17%	20%

TABEL 3

SAM. n H_2SO_4

n	resterende fugtighed	Nedbrydning ved 45 °C efter 60 dage	120 dage	180 dage	240 dage	360 dage
0,5	0,2%	100%	100%	100%	100%	100%
1	0,5%	80%	100%	100%	100%	100%
1,5	0,8%	30%	60%	80%	100%	100%
2	1 %	5%	10%	14%	17%	20%
2,5	1,5%	-	1,5%	3%	4,5%	5%
3	2 %	5%	10%	14%	17%	20%

TABEL 4

SAM. 1,5 H_2SO_4. n HCl

n	resterende fugtighed	Nedbrydning ved 45 °C efter 60 dage	120 dage	180 dage	240 dage	360 dage
1	1 %	5%	10%	14%	17%	20%
2	1,5%	-	1,5%	3%	4,5%	5%
3	2 %	5%	10%	14%	17%	20%

TABEL 5

SAM. 2HCl. nH_2SO_4

n	resterende fugtighed	Nedbrydning ved 45 °C efter 60 dage	120 dage	180 dage	240 dage	360 dage
0,5	0,8%	30%	60%	80%	100%	100%
1	1 %	5%	10%	14%	17%	20%
1,5	1,5%	-	1,5%	3%	4,5%	5%
2	2%	5%	10%	14%	17%	20%

Det procentvise resterende SAM-indhold på de angivne tidspunkter blev bestemt ved en ny metode, som beskrives i det følgende, og som sikrer en maksimal målenøjagtighed derved, at den gør det muligt at adskille SAM fuldstændig fra samtlige mulige nedbrydningsprodukter.

I denne sammenhæng har det vist sig, at det med den hidtil anvendte metode, som er baseret på en analytisk kolonne indeholdende en Dowex®50 ionbytterharpiks (Schlenk og De Palma: J. Biol. Chem. 229 (1957)), ikke har været muligt at foretage en fuldstændig adskillelse af SAM fra visse nedbrydningsprodukter, i særdeleshed fra methylthioadenosin, og at denne hidtil anvendte metode derfor førte til en fejl i bestemmelsen af stabiliteten af SAM. Forbindelsen forekom således at være bedre, end den faktisk var.

Den benyttede metode til bestemmelse af SAM er baseret på en anvendelse af højtryksvæskechromatografi (HPLC).

De anvendte analytiske betingelser var følgende:

- kolonne	PARTISIL 10 SCX - 2,5 x 250 mm
- elueringsmiddel	0,1 M ammoniumformiat med pH 4, indeholdende 20% methanol til HPLC
- strømningshastighed	1 ml/minut
- SAM retentionstid	omkring 400 sekunder.

Fra de i tabel 2, 3, 4 og 5 anførte data er det klart, at SAM-salte opnår den maksimale stabilitet, når de indeholder 5 syreækvivalenter. Salte med 4 eller 6 ækvivalenter har dog også en rimelig god stabilitet, hvorimod salte med et mindre antal syreækvivalenter ikke finder praktisk anvendelse på grund af deres mangel på stabilitet.

Det fremgår også klart, at stabiliteten følger det samme mønster uafhængigt af den anvendte syre, forudsat at der er tale om en syre med en pK-værdi på under 2,5.

Der har været gennemført stabilitetsundersøgelser ved brug af den samme metode anvendt på salte fremstillet i nærværelse af en støtte for lyophiliseringen, i overensstemmelse med eksempel 3 og 4.

Resultaterne af disse bestemmelser er anført i de efterfølgende tabeller 6 og 7. Den drastiske reduktion i fugtighedsindholdet, som optræder, når lyophiliseringen gennemføres i nærværelse af en støtte, fremgår tydeligt sammen med den konsekvente totale stabilitet af saltene, som opnås på denne måde.

TABEL 6

SAM. 5 HCl

	Resterende fugtighed	Nedbrydning ved 45 °C efter 360 dage
Lyophiliseret uden støtte	1,5%	5%
Lyophiliseret med mannitol (100 g SAM^+ + 120 g mannitol)	0,1%	-
Lyophiliseret med aerosil (100 g SAM^+ + 100 g aerosil)	0,2%	-

TABEL 7

SAM. 2,5 H_2SO_4

	Resterende fugtighed	Nedbrydning ved 45 °C efter 360 dage
Lyophiliseret uden støtte	1,5%	5%
Lyophiliseret med mannitol (100 g SAM^+ + 120 g mannitol	0,1%	-
Lyophiliseret med aerosil (100 g SAM^+ + 100 g aerosil)	0,2%	-

Saltene SAM. 5 HCl og SAM. 2,5 H_2SO_4 blev afprøvet i en bredspektret farmakologisk undersøgelse, og i alle tilfælde udviste disse salte særdeles interessante aktivitets- og toxicitetskarakteristika, som var uafhængige af anionen bundet til SAM. Det viste sig, at aktiviteten af de hidtil ukendte salte i det væsentlige afhænger af den i organismen frigivne SAM^+-ions evne til at virke som en donor for methylgrupper som et naturligt substrat for et stort antal transmethylase-enzymer, der katalyserer de fundamentale reaktioner i lipid-, protid- og glucosid-metabolisme.

Betydningen af de omhandlede salte udspringer således i det væsentlige af det faktum, at de gør S-adenosylmethionin absolut stabil ved temperaturer op til 45 °C, således at det bliver muligt at udnytte denne forbindelses transmethylerende virkning i den menneskelige organisme 100%, uden at der opstår risiko for dannelse af toxiske nedbrydningsprodukter, som på negativ måde griber ind i de biologiske processer, der aktiveres af SAM^+.

Toxicitet

Den akutte toxicitet bestemtes på mus, og der opnåedes følgende værdier for begge salte:

LD_{50} ved oral administration: > 3 g/kg
LD_{50} ved intravenøs administration: 1,1 g/kg.

Der gennemførtes undersøgelser af de tilladelige mængder og den kroniske toxicitet på rotter af stammerne Wistar og Sprague-Dowley, idet man indgav forbindelserne i mængder på 20 mg/kg pr. dag i 12 måneder. Ved behandlingens afslutning udviste de forskellige organer og systemer ikke nogen patologiske ændringer.

Man gennemførte undersøgelser af teratogenesen hos kaniner. Når indgav doser af saltene, som var 10 gange større end de maksimale terapeutiske doser, var det ikke muligt at iagttage nogen teratogene virkninger eller misdannende virkninger på fostre eller terminale fostre.

Intravenøse indgivelser i doser på op til 200 mg/kg gav ikke nogen pyrogene udtryk hos kaniner.

Venøse indgivelser af forbindelserne i doser på 40 mg/kg til kaniner og rotter bevirkede ikke nogen ændringer i blodtrykket i halspulsårene og heller ingen ændringer i hjerte- og respirationsfrekvenserne, ligesom der ikke kunne iagttages ændringer i de elektrokardiografiske billeder.

Det har vist sig, at den lokale tolerance ved intramuskulære injektioner, også efter gentagne indgivelser i 30 - 60 dage, og den lokale tolerance ved intravenøse injektioner i den marginale vene i øret hos kaniner er fremragende.

Farmakologi

En lang række forsøg udført på rotter har vist, at saltene fremstillet ifølge opfindelsen udøver en betragtelig beskyttende og opløsende virkning på steatosis hepatis (fedtlever) induceret ved hjælp af en hyperlipid-hyperprotein-diæt i overensstemmelse med Handler, og også på steatosis induceret ved akut alkoholforgiftning og ved forgiftning med andre toxiske midler, også når der indgives doser på 10 mg/kg SAM^+.

Ved eksperimentel hyperlipidæmi hos rotter, f.eks. induceret ved hjælp af Triton S, har saltene ifølge opfindelsen udvist en meget iøjnefaldende hypolipidæmisk virkning, som set i relation til den anvendte dosis, nærmere bestemt 10 mg/kg (igen udtrykt i SAM^+), var meget mere intens end i de tilfælde, hvor der anvendtes andre medikamenter med hypolipidæmisk virkning.

Hos kyllinger med atherosclerose, som var fremkaldt ved hjælp af diæter beriget med cholesterol og fructose, viste det sig muligt ved parenteral indgivelse af forbindelserne ifølge opfindelsen i doser på 10 mg/kg at reducere forekomsten af cholesterolæmi, og det blev også muligt at modificere de læsioner, som kunne iagttages hos kontroldyrene, med hensyn til den thorakale og abdominale aorta og med hensyn til de små kar i hjernens basis.

Med hensyn til phospholopid-metabolismen har det eksperimentelt vist sig, at der sker en stigning i mængden af phosphatidylcholin i levervævet hos rotter med ikke-kompenseret steatosis. Det var også muligt at bestemme en tydelig forøgelse i indholdet af phosphatidylcholin på bekostning af de hæmatiske α-lipoproteiner i eksperimentelle ændringer fremkaldt af β/α-lipoprotein-forholdene.

Alle disse forsøg har klart vist en helbredende virkning

af saltene fremstillet ifølge opfindelsen med hensyn til ændringer i lipid-metabolismen.

Et yderligere antal forsøg udført på rotter har vist, at en indgivelse af saltene fremstillet ifølge opfindelsen i doser på 1 mg/kg bevirker en akkumulering af glycogen-reserverne på lever- og muskelniveau, hvilket kan eftervises såvel ved histokemiske metoder som ved kvantitative bestemmelser. I en eksperimentel diabetes induceret af alloxan kan den mængde insulin, som er nødvendig for at reducere glykæmi-værdierne til et normalt niveau, reduceres betragteligt ved indgivelser svarende til 0,5 mg/kg SAM^+.

Denne række af forsøg har klart vist, at forbindelserne fremstillet ifølge opfindelsen udviser en positiv virkning på glucosid-metabolismen.

Endelig har man behandlet rotter med eksperimentelt induceret hypodisproteinæmi med mængder på 10 mg/kg SAM. Det viste sig, at produktet bevirker en reduktion af de totale proteinæmi-værdier til et normalt niveau, idet der sker en væsentlig forøgelse af albumin-niveauet, hvilket efterviser en bemærkelsesværdig protein-anabolisk virkning.

Dette og andre tilsvarende forsøg har eftervist, at forbindelserne fremstillet ifølge opfindelsen har en helbredende virkning på forstyrrelser i protid-metabolismen.

På basis af de ovenfor beskrevne farmakologiske forsøg og på basis af mange andre forsøg, som har gjort det muligt at undersøge virkningen af de omhandlede salte på alle niveauer i den menneskelige organisme, kan det sammenfattende siges, at de hidtil ukendte produkters aktivitet er klinisk fastslået inden for hepatologien med hensyn til akutte og kroniske leverforgiftninger, inden for neurologien med hensyn til virkningen som anti-depressive midler og inden for osteologien med hensyn til virkningen på rheuma-

toid arthritis.

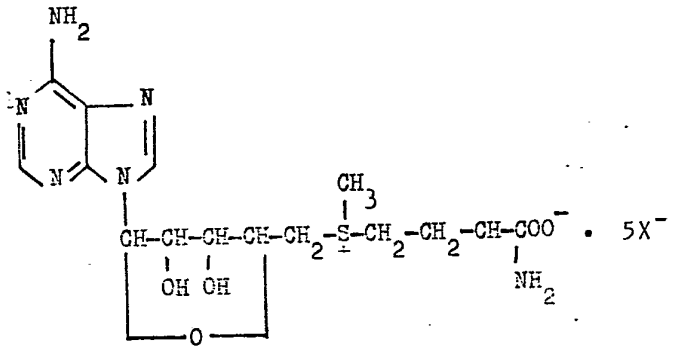
De omhandlede forbindelsers virkning inden for en række andre områder af den humane terapi er i øjeblikket under udforskning.

Saltene fremstillet ifølge opfindelsen kan indgives oralt, eller de kan indgives ved intramuskulær eller intravenøs injektion.

Blandt de andre mulige indgivelsesformer kan nævnes stikpiller, væsker til okular anbringelse, aerosoler og formuleringer til topisk påføring.

P a t e n t k r a v:

1. Analogifremgangsmåde til fremstilling af S-adenosylmethioninsalte (SAM-salte) med den almene formel:



hvori X er en syreækvivalent af HCl, H_2SO_4 eller H_3PO_4, k e n d e t e g n e t ved, at man renser en koncentreret vandig opløsning af et råt SAM-salt ved at lede opløsningen igennem en kolonne indeholdende en svagt sur ionbytterharpiks, eluerer SAM med en fortyndet vandig opløsning af den krævede syre HX, tilsætter den syremængde, som er nødvendig for nøjagtigt at opnå den støkiometriske mængde svarende til det krævede salt, koncentrerer opløsningen og fraseparerer det rene salt ved lyophilisering.

2. Analogifremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g - n e t ved, at pH-værdien af den vandige SAM-opløsning justeres til mellem 6 og 7, fortrinsvis til 6,5.

3. Analogifremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g - n e t ved, at opløsningen af syren HX, der anvendes som elueringsmiddel, har en koncentration på 0,1 N.

4. Analogifremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g - n e t ved, at den mængde af syren HX, som mangler for at opnå den støkiometriske mængde, sættes til eluatet i form af en kommercielt koncentreret vandig opløsning.

5. Analogifremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g - n e t ved, at et eventuelt overskud af syren HX i eluatet i forhold til den støkiometriske mængde elimineres ved hjælp af en stærkt basisk ionbytterharpiks.

6. Analogifremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g - n e t ved, at man koncentrerer eluatet til et indhold af SAM på mellem 50 og 100 g/liter.

Fremdragne publikationer:
DK ansøgning nr. 3153/75 (patent nr. 144946).